

**Biochemische Studien an
elektrophoretisch getrennten menschlichen
Organhomogenaten**

Unter Verwendung der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

von

Hans-Georg Heinze

aus

Gleiwitz O/S

1969

1970 № 118



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546202_0108

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Biochemische Studien an elektrophoretisch getrennten menschlichen Organhomogenaten

Unter Verwendung der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Hans-Georg Heinze

aus

Gleiwitz O/S

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. H. Valentin
Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth
Tag der mündlichen Prüfung: 26. 9. 1969

Herrn Professor Dr.Fr.Scheiffarth möchte ich für die freundliche Übernahme des Referates und die Überlassung des Themas herzlich danken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Frl.Priv.-Doz. Dr.H.Götz, die mir immer mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand, meinen Dank auszusprechen.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Untersuchungsgut und Versuchsanordnung	2 - 3
Methodik	3 - 6
Biochemische Nachweismethoden	6 -11
Ergebnisse	11 -15
Diskussion	15 -17
Zusammenfassung	17 -18
Literaturverzeichnis	19 -22

E i n l e i t u n g :

Das Anwendungsgebiet der Polyacrylamid-Gel-(PAA-Gel)-Elektrophorese wurde in den letzten Jahren seit der Entwicklung dieser Methode(3,4,5,14,23) von verschiedenster Seite vor allem mit der Frage einer besseren Differenzierungsmöglichkeit von Proteingemischen geprüft. Es wurde ferner beurteilt, inwieweit diese Methode auch der Differenzierung pathologischer menschlicher Seren als Routinemethode für die klinische Diagnostik Bedeutung erlangt. Sicher sind die bisherigen Studien zu diesen hier angeschnittenen Fragen noch keineswegs abgerundet, und sicher sind auch die methodischen Möglichkeiten, die vor allem zur Vereinfachung der Technik beitragen, noch nicht erschöpft. Soweit anhand bisheriger Erfahrungen der Stand des heute gehandhabten PAA-Gel-Elektrophoreseverfahrens zu überblicken ist, bedarf die Methodik vor allem für die klinische Routine einer weitgehenden Vereinfachung, ehe sie andere Elektrophoresemethoden übertreffen wird.

In vorliegender Arbeit wurden menschliche Organhomogenate im Vergleich zu Humanserum im PAA-Gel getrennt und die dabei differenzierten Proteinfractionen unter Anwendung verschiedener biochemischer Reaktionen näher charakterisiert.

Hauptteil:

I) Untersuchungsgut und

Versuchsanordnung:

1) Untersuchungsgut:

Es wurden insgesamt zwölf verschiedene Präparate der menschlichen histologisch unveränderten Leber, sowie neun verschiedene Organpräparate des menschlich gesunden Herzens analysiert. Dabei handelte es sich um Leichenorgane⁺), die acht Stunden post mortem präpariert wurden.

2) Versuchsanordnung:

Im einzelnen wurde jedes Organpräparat homogenisiert, tief gefroren⁺⁺) (-20°C) und die einzelnen Homogenate vor den Analysengängen für jedes Organ gepoolt. Von jedem Organpool wurde je eine Probe für folgende Analysensätze verwendet:

Die Homogenate wurden im PAA-Gel elektrophoretisch getrennt und anschließend die gewonnenen Fraktionen mit Amidoschwarz 10 B zur Darstellung gebracht, in weiteren Ansätzen auf ihren Glykoproteidgehalt unter Verwendung von Perjodsäure und Schiffs Reagens, ferner auf ihren Gehalt an Lipoproteiden unter Verwendung von Sudan-schwarz B, auf ihren Anteil esteraseaktiver Komponenten, sowie schließlich auf Isoenzyme der LDH geprüft. Mit jedem Analysensatz wurde ein menschliches Normalserum vergleichsweise mitdifferenziert. Die gewonnenen Ergeb-

⁺) Die Organe verdanken wir dem Pathologischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg. (Direktor Prof. Dr. E. Müller)

⁺⁺) Tiefkühltruhe BBC

nisse bzw. Fraktionen wurden sowohl photometrisch ausgewertet als auch photographisch dokumentiert.

II) M e t h o d i k

1) Aufbereitung der Organe (8,17)

Die grob zerkleinerten Organe wurden ca zwei Stunden unter fließendem Wasser entblutet, danach im Verhältnis 1:4 mit physiologischer Kochsalzlösung vermengt und im Eisbad durch den Ultra-Turrax-Stab⁺) zertrümmert. Das so gewonnene Organhomogenat wurde 30 Minuten bei ca 4800 Upm. in der Kühlzentrifuge, bei 4°C zentrifugiert, und der Überstand durch Dialyse gegen 20%iges Kollidon auf 4 g% Gesamteiweißgehalt eingeengt.

2) PAA-Gel-Elektrophorese

Es wurde im Prinzip nach den Angaben von BIEL und ZWISLER (3,4,23) vorgegangen. Im einzelnen wurden für die vorliegenden Analysen folgende Versuchsbedingungen gewählt.

Herstellung des PAA-Gels

a) R e a g e n z i e n :

Cyanogum 41 (Fa SERVA Heidelberg)

66 g ad 1000 ml Aqua dest.

Tris: 2,54 m, Molekulargewicht 121,14

307,7 g Tris ad 1000 ml Aqua dest.

Citronensäure: 2,54 m, Molekulargewicht 210,15

533,8 g Citronensäure ad 1000 ml
Aqua dest.

Borsäure: 1,094 m, Molekulargewicht 61,83

67,6 g Borsäure ad 1000 ml Aqua dest.

Natronlauge: 1,094 m, Molekulargewicht 40

43,8 g ad 1000 ml Aqua dest.

Katalysatoren: Ammoniumperoxydisulfat (AP)

B-Dimethylaminopropionitril (DMAPN)

⁺) Fa JANKE & KUNKEL, Staufen i. Breisgau

⁺⁺) Fa CHRIST

b) P u f f e r :

Es werden α ein Gel-Puffer und β ein Elektroden-Puffer benötigt.

α) Gel-Puffer: Der Gel-Puffer setzt sich aus der Tris-Citronensäure und der NaOH-Borsäure zusammen.

Tris-Citronensäure: Auf 51,5 ml Tris kommen 6 ml Citronensäure.

NaOH-Borsäure: 10,95 g NaOH (Natriumplättchen) + 50,7g Borsäurekristalle werden in ca 250 ml Aqua dest. vollkommen gelöst und anschließend auf 1000 ml Aqua dest. aufgefüllt. Die Molarität (m) der Natronlauge und Borsäure beträgt bei diesem Gewichtsverhältnis 1,094.

Zum Gebrauch werden gemischt:

12,20 ml Tris-Citronensäure
+ 4,95 ml NaOH-Borsäure

17,15 ml Tris-Borat-Puffer-Stammlösung pH 8,6-8,7
ad 500 ml Aqua dest. ergibt fertigen Gel-Puffer.

Diese Tris-Borat-Puffer-Stammlösung sollte bei jedem Versuch frisch angesetzt werden.

β) Elektroden-Puffer: Der NaOH-Borsäure-Puffer wird im Verhältnis 1 Teil + 2 Teile H_2O verdünnt. Der Elektroden-Puffer ist möglichst nach jeder Elektrophorese zu mischen und öfters zu erneuern.

c) G e l - B e r e i t u n g :

Cyanogum 41 wird 6,6%ig in Tris-Borat-Gel-Puffer gelöst, d.h. 6,6,g Cyanogum 41 in 100 ml Tris-Borat-Gel-Puffer, oder im Versuch:

17,15 ml Tris-Borat-Gel-Puffer ad 500 ml
+ 33,00 g Cyanogum 41 Aqua dest.

Katalysiert wird mit Ammoniumperoxydisulfat (AP) und β -Dimethylaminopropionitril (DMAPN) Auf je 10 g Cyanogum 41 entfallen 100 mg AP + 1000 mg DMAPN. Die Katalysatoren werden in verdünnter Form zugegeben. Auf 1000 ml 6,6%ige Cyanogum-Lösung kommen 100 ml AP und 100 ml DMAPN-Lösung. Um lokale Polymerisation zu verhindern, sollte während der Zugabe der Katalysatoren gerührt werden.

d) A p p a r a t u r :

Es wurden Glasplatten mit den Abmessungen von 21 cm x 16 cm verwendet, die mit einem 1 cm breiten und 2 mm hohen Glasrand umklebt waren, sowie Deckplatten passender Größe. Als Puffertrog kann jedes Gefäß geeigneter Breite Verwendung finden. Um eine Auftragestelle zu erhalten, die ein einwandfreies Abwandern der Proteine vom Filterpapier in das Gel gestattet, wird an die Unterseite der Deckplatte ein 1 cm breiter und über die lichte Kammerbreite reichender Agarstreifen von ca 1 mm Höhe gelegt, 3-4 cm vom kathodischen Kammerrand entfernt. Die Kammer wird mit der gepufferten Cyanogum-Lösung und den Katalysatoren im Überschuß ausgegossen und durch schräges Auflegen der Deckplatte luftblasenfrei verschlossen. Die Liegezeit beträgt eine Stunde. Danach wird die Deckplatte langsam abgehoben und der Agarstreifen vorsichtig aus dem Gel entfernt. Die so entstandene Rinne sollte eine klebrige Konsistenz zeigen. Die proteingetränkten Filterpapierstreifen (SCHLEICHER & SCHÜLL Nr 2315 oder WATHMANN Nr 12Q) werden in die Mitte der Rinne gelegt. Optimale elektrophoretische Ergebnisse wurden mit 1,4 - 1,9 mg Protein erzielt, d.h. 0,02-0,03 ml auf einen

doppelten Filterpapierstreifen von 1 cm Länge und 0,4 cm Breite.

e) E l e k t r o p h o r e s e :

Als Elektrodenpuffer dient der NaOH-Borsäurepuffer, der im Verhältnis 1 Teil + 2 Teile Aqua dest. verdünnt wird. Über die Auftragerinne wird ein Celluloidstreifen zum Schutze der Austrocknung gelegt, durch Filterpapier der Kontakt mit den Elektrodengefäßen hergestellt. Eine knitterfreie Polyäthylenfolie und eine Glasplatte decken das Gel ab. Danach werden 5 V/cm Gleichstrom angelegt. Unter den gegebenen Bedingungen wurden die besten Ergebnisse bei 50 - 60 Volt und einer Stromflußdauer von ca 10 Stunden erzielt. Bei dieser Spannung war die Boratfront ungefähr identisch mit den Präalbuminen. Die Wanderungsstrecke betrug etwa 10 cm. Bei einer Spannung von 100 Volt waren zwar die Banden schärfer, aber die Differenzierung der Proteine war nicht so ergiebig.

3) Biochemische Nachweismethoden:

Im einzelnen wurden folgende Methoden angewandt:

- a) Proteinfärbung (10,11)
- b) Lipoproteiddarstellung (7,10,11)
- c) Glykoproteiddarstellung (7,10,11)
- d) Esterasenachweis: Reaktion mit Indoxylacetat (11,15,21)
Reaktion mit β -Naphthylacetat (11,15,21)
- e) Nachweis der LDH (16,22)

Die biochemischen Nachweismethoden wurden im wesentlichen nach zum Teil eigenen Erfahrungen in Kombination mit der Agar-Elektrophorese (15,18), zum Teil aber auch nach Angaben der

einschlägigen Literatur unter Berücksichtigung des PAA-Gels (14) vorgenommen.

a) P r o t e i n f ä r b u n g m i t

A m i d o s c h w a r z 10 B

Herstellung der Färbelösung:

1 g Amidoschwarz 10 B in 1 l eines Gemisches von Acetatpuffer pH 3,7 und 15%igem Glyzerin lösen.

Acetatpuffer:

500 ml Essigsäure (60 ml Eisessig / 1 l)

500 ml Acetatlösung (Na-Acetat·3 H₂O, 13,6g /l)

zu 850 ml Puffer werden 150 ml Glyzerin gegeben.

b) L i p o p r o t e i d f ä r b u n g :

1%ige Sudanschwarz B Lösung wird in 60%igem Alkohol gelöst. Diese Lösung wird filtriert und in einem Wasserbad erhitzt. (auf wenigstens 40°C abkühlen lassen und für die Färbung verwenden) Das PAA-Gel wird 90 Minuten gefärbt, am besten in verschlossenen Gefäßen. Anschließend entfärben durch mehrmaliges Hineinlegen in ein Bad von 50%igem Äthanol.

c) G l y k o p r o t e i d f ä r b u n g :

Glykoproteide werden mit Perjodsäure und SCHIFF-(PAS-) Reagens identifiziert. Dazu werden die Gele nach der Elektrophorese eine Stunde bei 20°C in 7,5%iger Essigsäure und dann eine Stunde bei 4°C in 0,2%iger wäßriger Perjodsäurelösung gehalten, worauf der Überschuß an Perjodsäure elektrophoretisch in 7,5%iger Essigsäure entfernt wird (eine Stunde) Schließlich wird in Schiff's Reagens bei 4°C inkubiert, bis die Banden rot erscheinen.

Man bewahrt in SCHIFFS Reagens auf, oder, wenn für länger als einen Monat, in einer Lösung aus je einem Volumenanteil einer n HCl, einer 10%igen wäßrigen Kaliumbisulfit-oder Kaliummetabisulfat-Lösung und 10 Teilen Wasser; dieses Gemisch ist zunächst 7 mal im Abstand von zwei Stunden zu erneuern.

Herstellung von SCHIFFS Reagens:

Einer 0,5%igen wäßrigen Lösung von Pararosanilin (C.I.Nr 42500) werden 1 g Kalium-oder Natriumbisulfit und 10 ml einer n HCl zugefügt, das Gemisch drei Stunden geschüttelt und nach Zusatz von 0,2-0,5 g Aktivkohle filtriert. Man bewahrt in einer gut schließenden Flasche bei 4°C auf.

d) Nachweis der esteraseaktiven Fermente:

Die in den Organextrakten enthaltenen esteraseaktiven Komponenten wurden mit den von URIEL (21) beschriebenen Methoden bestimmt. Dabei wurde in einer ersten Versuchsreihe als Substrat Indoxylacetat verwendet, bei welchem das unter der Fermentwirkung freigewordene Indoxyl durch den atmosphärischen Sauerstoff zu Indigo oxydiert wird und eine Blaufärbung hinterläßt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde β -Naphthylacetat angewendet, wobei es durch eine Reaktion des durch die Fermentwirkung freigewordene β -Naphthols mit einem Diazoniumsalz zu einer Rotviolettfärbung der esteraseaktiven Komponente kommt. Methodisch wurde im einzelnen wie folgt vorgegangen:

Färbung mit Indoxylacetat

Reagenzien: Indoxylacetat
Aceton
Na-Veronal-Puffer pH 8,2
Kupferacetat 10^{-3} molar

Aufbereitung der Inkubationslösung: 5 mg Indoxylacetat werden in 0,5 ml Aceton gelöst und sofort danach 22 ml Na-Veronal-Puffer und 2,5 ml der 10^{-3} molaren Kupferacetatlösung versetzt. Dieses Gemisch muß innerhalb der nächsten acht Stunden verwendet werden.

Arbeitsgang: Unmittelbar nach abgeschlossener Elektrophorese wird das PAA-Gel ca fünf Stunden bei 37°C in die bereitete Inkubationslösung gelegt.

Färbung mit β -Naphthylacetat:

Reagenzien: β -Naphthylacetat
Aceton
Phosphatpuffer pH 7,4
Diazoblau B
Essigsäure 2%ig

Aufbereitung der Inkubationslösung: 5 mg Naphthylacetat werden in 0,25 ml Aceton gelöst. Danach werden 25 ml des Phosphatpuffers hinzugegeben. Es bildet sich eine Opaleszenz, die sich jedoch ohne weiteres wieder löst; hierin werden 10 mg Diazoblau B gelöst. Das Ganze wird filtriert und unverzüglich gebraucht.

Arbeitsgang: Man taucht unmittelbar nach abgeschlossener Elektrophorese das PAA-Gel zwei Stunden bei 37°C in das aufbereitete Inkubationsmilieu.

e) N a c h w e i s d e r L a c t a t d e h y d r o g e n a s e :

Die Fermentfarbreaktion wurde nach dem Prinzip von DEWEY und CONKLIN (5), bzw. der modifizierten Methode von VAN DER HELM (22), vorgenommen.

Reagenzien: Natriumlactat ($\bar{\text{M}}$)
Kaliumcyanid 0,1 m
Phosphatpuffer (pH 7,4 0,5 m)

.Nitro BT 1 mg/ml

Phenazinmethosulfat 1 mg/ml

Inkubationslösung mit Farbreagens

Zunächst werden 2 l eines Phosphatpuffers nach SÖRENSEN hergestellt, indem 1636 ml 0,5 molares $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ mit 364 ml 0,5 molarem KH_2PO_4 aufgefüllt wurden. Die Kontrolle mit der Glaselektrode ergab für den Puffer einen pH-Wert von 7,38. Um das Substrat der enzymatischen Reaktion, das Lactat, in eine ungefähr molare Konzentration zu bringen, wurden 12 ml einer 50%igen Natriumlactatlösung mit Aqua dest. auf 54 ml aufgefüllt. 352 mg Cyankali wurden in 50 ml Aqua dest. gelöst, was einer Konzentration des Salzes von 0,1 Mol/l entspricht.

Ebenso wurden 50 mg Nitroblau-Tetrazolium in 50 ml Aqua dest. gelöst. Als Stammlösung wurden 125 ml SÖRENSEN-Puffer, 50 ml etwa 1 m Natriumlactatlösung, 50 ml 0,1 m Kaliumcyanidlösung und 50 ml Nitro-BT-Lösung gemischt.

Von der Stammlösung wurden je nach Größe des Inkubationsgefäßes 28 ml, 70 ml, 140 ml genommen und DPN, sowie Phenazinmethosulfat in entsprechendem Verhältnis zugesetzt. Für 28 ml Stammlösung waren es: 40 mg DPN in 4 ml und 1 mg PMS in 1 ml Aqua dest. gelöst, für 70 ml Stammlösung die 2,5 fache Menge an Lösungsmittel und gelöstem Stoff. Die endgültige Inkubationslösung wurde kurz vor dem Ansetzen der Reaktion hergestellt. Die gelbe Phenazinmethosulfatlösung verändert sich unter der Einwirkung des Lichtes über einen grünen Farbumschlag in rot und verliert damit wahrscheinlich ihre Wirksamkeit, während das Diphosphorpyridinnucleotid nach Angaben der Herstellerfirma in Pulverform bei Kühlschranktemperatur

länger haltbar ist. Von der Inkubationslösung wurde soviel in die Plastikschaalen gegeben, bis das PAA-Gel gut bedeckt war. Nach 60 Min. wurden bei 37°C die ersten zart gefärbten Banden sichtbar, nach 90 Min. konnte die Inkubation beendet werden. Das PAA-Gel wurde mit Wasser abgespült und die Farbdichte und Verteilung der LDH mit dem Extinktionsschreiber aufgezeichnet.

4) Dokumentation

Die photometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Extinktionsschreibers der Firma ZEISS¹⁾ unter Verwendung eines Filters mit der Wellenlänge 540 m. (Verschiedene Filter in Abhängigkeit von der Farbreaktion) Darüberhinaus wurden die Ergebnisse farbphotographisch festgehalten. Verwendet wurden Agfa-Color Umkehrfilme für Kunstlicht CK 20 DIN 80 ASA.

III) E r g e b n i s s e :

1) Befunde nach PAA-Gel-Elektrophorese und Färbung mit Amidoschwarz 10 B (Abb. 1)

Bei Trennung des Leberhomogenats stellten sich insgesamt 15 Fraktionen dar, die im Vergleich zu einem mitgewanderten menschlichen Serum, vorwiegend der grob-dispersen Phase, also den Globulinen zuzuordnen war, während eine Komponente vom Typ des Albumins wesentlich geringer konzentriert in Erscheinung trat. An Albumin-vorfraktionen konnte im Leberhomogenat ein bis zwei Komponenten dargestellt werden. Relativ deutlich war ein Proteinkomplex im Bereich der β -Globuline anfärbbar, der im allgemeinen vier Subfraktionen erkennen ließ.

¹⁾ Firma CARL ZEISS

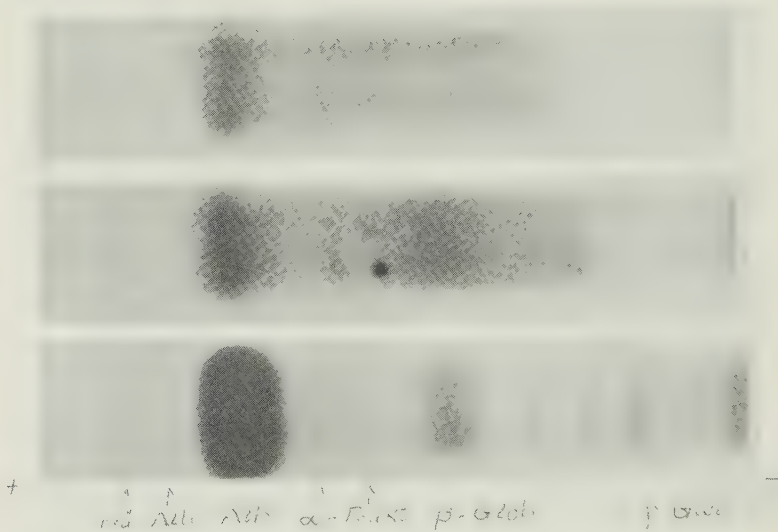


Abb.: 1

Originalstreifen der im PAA-Gel getrennten und mit Amidoschwarz gefärbten löslichen Proteine eines Leber- (oben) und eines Herzmuskelhomogenats (mitte) im Vergleich zum menschlichen Serum (unten)

Im Vergleich zum Leberhomogenat zeigten die löslichen Proteine der Herzmuskulatur insofern ein ähnliches Muster, als auch hier die Albumin-Globulin-Relation zugunsten der Globuline verschoben war. Sie zeigten aber insofern ein Charakteristikum, als mit Regelmäßigkeit einzelne schnellwandernde α -Globuline deutlicher zur Darstellung gelangten, als z.B. im Leberextrakt oder im Normalserum. Im Serum konnten zwischen 12 und 18 Fraktionen differenziert werden.

2) Befunde nach PAA-Gel-Elektrophorese und Lipoprotein-Färbung

Dieselben Organhomogenate wurden in einem zweiten Analysensatz nach Trennung im PAA-Gel nunmehr mit Sudanschwarz B gefärbt. Die Ausbeute war im allgemeinen gering; Farbreaktionen zeigten sich vielfach als relativ scharf begrenzte Fraktionen unmittelbar vor der Auftragestelle, sowie als zwei weniger scharf begrenzte und nur schwach angefärbte Komponenten mit wesentlich schnellerer Wanderungsgeschwindigkeit. Im Leberhomogenat konnten insgesamt vier schwach angefärbte Bezirke dargestellt werden, die sich vom Präalbuminbereich bis nahe der Auftragestelle verteilten.

(Abb. 2) Eine Differenzierung dieser Bezirke in mehrere Unterfraktionen gelang nicht.

Im Herzmuskelhomogenat waren ebenfalls vier schwache Fraktionen an unterschiedlicher Stelle der Trennstrecke nachweisbar. (Abb. 2) Im Serum ließen sich im wesentlichen zwei sudanschwarz-färbbare Komplexe darstellen, wovon einer im kathodennahen Bereich der Trennstrecke, der andere etwa im Bereich der Albumine zur Darstellung gelangten.

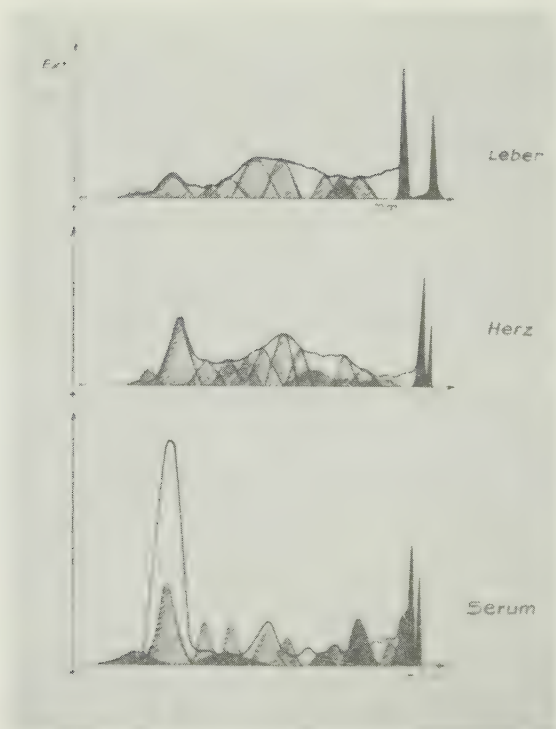


Abb.: 2

Diagramme der verschieden gefärbten und in die Gradientenkurve der Proteinfractionen projizierten löslichen Proteine von Leber- und Herzmuskelhomogenat im Vergleich zu einem normalen Serum.

rot = Glykoproteide, schwarz = Lipoproteide

In Einzelfällen konnte darüberhinaus vor dem weit anodisch gelegenen Farbkomplex eine zusätzliche schwach getönte Fraktion wahrgenommen werden.

3) Befunde nach PAA-Gel-Elektrophorese und Darstellung von Glykoproteiden. (Abb. 2)

Die kombinierte Färbung mit Perjodsäure in SCHIFFS Reagens konnten im Leberhomogenat über den gesamten elektrophoretischen Trennbereich verteilt, insgesamt 8 blaßrosa gefärbte Banden nachgewiesen werden. Im Herzmuskel konnten ebenfalls bis zu 8 schwach gefärbte Fraktionen differenziert werden. Hier ließ sich allerdings eine Gruppierung in kathodennahe und in wesentlich schneller gewanderte Komponenten erkennen.

Im Serum ließen sich vom Albuminbereich bis in die Zone der γ -Globuline praktisch alle Proteine anfärben. Gewisse Intensitätsunterschiede konnten insofern festgestellt werden, als eine Gruppe von α_2 -Globulinen in Nähe der Albumine relativ stärker darstellbar war, als die meisten übrigen Proteine.

4) Befunde nach PAA-Gel-Elektrophorese und Reaktion mit Indoxylacetat (Abb. 3 u. 4)

Bei Analysen des Leberhomogenats ergaben sich regelmäßig zwei deutlich gefärbte fermentaktive Komplexe, die ihrerseits jeweils mindestens zwei Subfraktionen erkennen ließen. Der eine der oben genannten Komplexe stellte sich als breitbasige Farbzone in unmittelbarer Nähe des Startes dar, er endete zumeist in der Gruppe der Transferine. Der

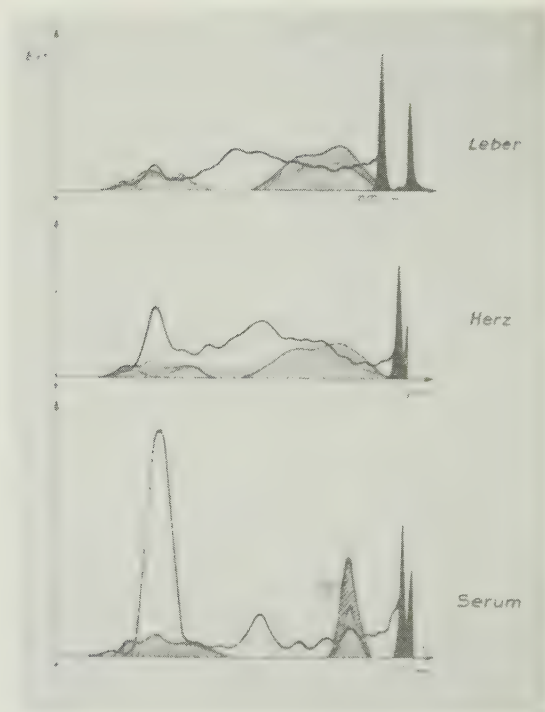


Abb.: 3

Diagramme der Cholinesterasen, sowie Pseudocholinesterasen von Leber-, Herzmuskel- und Serumproteinen, projiziert in die Gradientenkurve der reinen Proteinkomponenten.



Abb.: 4

Originalabbildung der esterasenaktiven Komponenten
verschiedener Organe und des menschlichen Serums:
(PAA-Gel-Elektrophorese)

zweite Komplex lag weit anodisch, etwa im Bereich der Albumine und der Präalbumine.

Im Homogenat des Herzmuskel konnten in allen Analysen insgesamt drei Farbzonen differenziert werden, die eine, die vor allem durch ihre Farbintensität und Breitbasigkeit in Erscheinung trat, ließ sich in eine Gruppe von langsam gewanderten Globulinen einordnen; sie ließ regelmäßig zwei Subfraktionen erkennen. Die beiden anderen Farbzonen waren in Bereichen unmittelbar vor und hinter der Albuminfraktion. Im Serum ließ sich an umschriebener Stelle eine scharf begrenzte, d.h. schmalbasige, deutlich angefärbte Fraktion in einem Bereich langsam gewanderter Globuline darstellen.

5) Befunde nach PAA-Gel-Elektrophorese und Reaktion mit β -Naphthylacetat (Abb. 3 u. 4)

Die Ergebnisse mit β -Naphthylacetat waren insgesamt bei allen Homogenaten, wie auch in vergleichsweise mit angesetztem Serum relativ ergiebiger, als die Befunde mit Indoxylacetat. Dabei erwiesen sich nicht so sehr die Fermentaktivitäten in den Homogenaten unterschiedlich, als die Befunde im Serum. Während im Leber- und Herzhomogenat vor allem der kathodennahe Komplex quantitativ stärker in Erscheinung trat, im übrigen aber keine zusätzlichen fermentaktiven Fraktionen nachweisbar wurden, ließen sich im Serum zu der auch mit Indoxylacetat darstellbaren Fraktionen drei weitere Komponenten aufzeigen. Diese lagen im weit anodischen Bereich. Sie ließen sich infolge ihrer Schmalbasigkeit exakt abgrenzen.

6) Befunde nach PAA-Gel-Elektrophorese und Darstellung der LDH

Mit der in vorliegender Arbeit angewandten Nachweisttechnik zur Darstellung von Isoenzymen der LDH konnten insgesamt nur wenig intensive Farbreaktionen objektiviert werden. Das gilt sowohl für die Organhomogenate, als auch für das Serum. Im Leberhomogenat konnten z.B. nur drei Isoenzyme der LDH färberisch nachgewiesen werden, zwei von ihnen im weit anodisch gewanderten Bereich, die dritte unmittelbar vor der Auftragestelle; diese extrem kathodisch gelegene Fraktion imponierte durch ihre wesentlich stärkere Farbreaktion. Im Herzmuskel dagegen fiel eine starke Farbreaktion im weit anodisch gelegenen Trennbereich auf. Daneben eine weniger deutlich gefärbte mit geringerer Wanderungsgeschwindigkeit, darüberhinaus zwei weitere im Bereich der Transferine, sowie im Bereich langsam gewanderter γ -Globuline.

Im Serum ließen sich dicht gedrängt im weit anodischen Bereich drei Farbzonen und außerdem unmittelbar vor der Auftragestelle eine weitere Komponente aufzeigen. (Abb. 5)

IV) D i s k u s s i o n

Die vorliegenden Ergebnisse nach kombinierter Elektrophorese im PAA-Gel und die biochemische Charakterisierung einer Reihe der darstellbaren löslichen Proteine des menschlichen Serum, sowie einzelner Organhomogenate haben insgesamt gezeigt, daß diese Technik eine Vielzahl neuer Gesichtspunkte aufwirft. Sie gestattet in erster Linie eine im Vergleich zu anderen Trennmedien, wie Papier, Cellulose-Acetat-Folie, Agar eine bessere Differenzierung, d.h. die Auflösung in eine größere

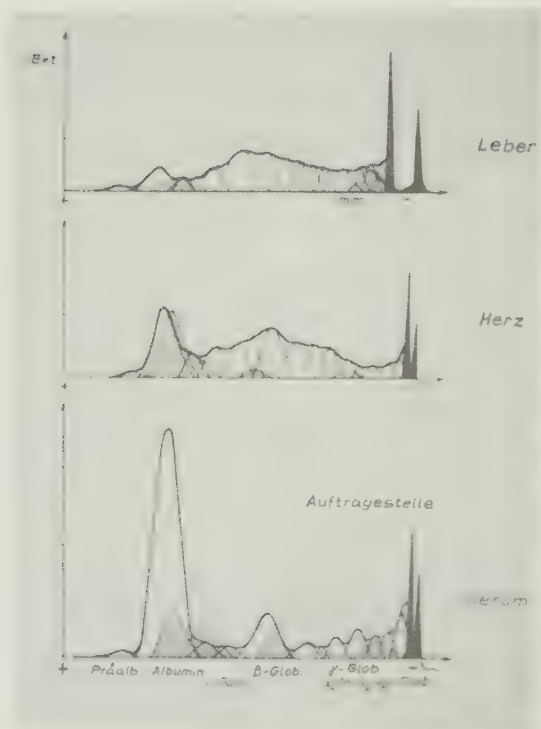


Abb.: 5

Darstellung LDH aktiver Fraktionen von Leber-, Herzmuskel und Serumproteinen nach Trennung im PAA-Gel.

Anzahl von wanderungsfähigen Proteinen, als mit den bisher üblichen Methoden. Die Trennung im PAA-Gel sind allenfalls vergleichbar mit Resultaten der Stärke-Gel-Elektrophorese. Mit dieser Bereicherung ergeben sich aber zugleich neue Befunde, die es notwendig erscheinen lassen, diese neuen Begebenheiten exakt aufzuklären. Hierfür stehen die Möglichkeiten der Elution und Sekundäranalyse der isolierten Komponenten zur Verfügung. Andererseits können die elektrophoretisch separierten Komponenten durch biochemische Reaktion vor allem mit dem Farbnachweis näher charakterisiert werden. Hier ergeben sich wegen der dichteren Vernetzung und ungleichen Dicke des PAA-Gels technische Schwierigkeiten auf dem Gebiete der Diffusion von Inkubations- und Farbstofflösungen, sowie der photometrischen Dokumentation. Außerdem zeigt das PAA-Gel einen raschen Austrocknungseffekt mit einer Schrumpfungstendenz. Die Inkubations- und Farbstofflösung müssen im Vergleich zur Agar- und Papier-Elektrophorese doppelt solange einwirken, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Bei Fermentnachweisreaktionen treten große Nachteile auf, da lange Inkubationszeiten benötigt werden und mit Rücksicht auf das PAA-Gel nicht immer optimale Temperaturen eingehalten werden können.

Die vorliegenden Einzelergebnisse haben immerhin mit Bezug auf die Proteincharakterisierung einige wertvolle Gesichtspunkte gebracht. Es konnte z.B. eine Anzahl von PAS färbbaren Komponenten im Serum und in verschiedenen Organhomogenaten nachgewiesen werden, wobei hier vor allem die Gruppe der α -Globuline, bzw. anodisch wandernder Proteine, offenbar

stärker in Erscheinung treten als die kathodisch gewanderten. Interessant erscheinen auch die Befunde des Esteraseverteilungsmusters, das sich mit Bezug auf die Pseudocholinesterasen von dem Verteilungsmuster der im Agar getrennten Serum- und Organproteine (16,19,20) insofern unterscheidet, als vor allem die Positionen der Esterasefraktionen mit agar-elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit vom Typ α_2 -Globuline bei Trennung im PAA-Gel im kathodennahen Bereich zur Darstellung gelangen. Für die Cholinesterase des Serums konnte bestätigt werden, daß diese nur eine Komponente im umschriebenen kathodennahen Bereich in Erscheinung tritt, wie dies von Haupt- und Mitarbeitern (9,12) ebenfalls mit der PAA-Gel-Elektrophorese aufgezeigt werden konnte. Im übrigen wurde dies schon früher durch URIEL (21) und auch vom eigenen Arbeitskreis demonstriert. Darüberhinaus konnte mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen bestätigt werden, daß in Organhomogenaten ein ausgesprochenes Cholinesterasemuster vorliegt, das sich praktisch über den gesamten Trennbereich der löslichen Organproteine erstreckt. (15) Die Fermentnachweisreaktion zur Aufklärung der Isoenzymmuster der LDH erwiesen sich, gemessen an der aufgetretenen Farbtintensität im PAA-Gel, als wenig ergiebig, als dies vom Agar-Gel, (22) vom Stärke-Gel und sogar von der Cellulose-Acetat-Folie her bekannt ist. (9,13)

V) Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurden menschliche Organhomogenate im Vergleich zu Humanserum im PAA-Gel getrennt und die dabei differenzierten Proteinfraktionen unter Anwendung verschiede-

ner biochemischer Reaktionen näher charakterisiert. Insgesamt wurden zwölf verschiedene Organpräparate der menschlichen histologisch unveränderten Leber, sowie neun verschiedene Organpräparate des menschlich gesunden Herzens analysiert. Für jedes Organ wurde ein Pool der verschiedenen Homogenate hergestellt, und jeweils eine Probe für die einzelnen Analysensätze verwendet. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die gewonnenen Fraktionen auf den Gehalt an Proteinen, Lipoproteinen, Glykoproteinen, Esterasen, sowie der LDH mit biochemischen Nachweismethoden, unter Berücksichtigung des PAA-Gels, geprüft. Die gewonnenen Ergebnisse wurden photometrisch ausgewertet und photographisch dokumentiert.

Die PAA-Gel-Elektrophorese bleibt zunächst noch eine Methode zur Analysierung von Proteingemischen, wie sie im wesentlichen der Grundlagenforschung dient. Sie stellt allerdings hier eine Bereicherung auf dem Gebiete der physikalischen Trennmethode dar. Es hat sich gezeigt, daß sich im Vergleich zu herkömmlichen Elektrophoreseverfahren die Trennung im PAA-Gel eine größere Anzahl von Protein- und auch Fermentkomponenten darstellen lassen. Zugleich ergeben sich aber Unterschiede in der Position einzelner Konstituenten innerhalb von Proteinmustern. Infolgedessen ist eine neue Zuordnung der getrennten Fraktionen zu bekannten Eiweißsystemen erforderlich. Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zu dieser grundlegenden Forderung dar.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) BARNETT, H.:
 - a) Dehydrogenase isoenzymes
Lancet II, 19, 199, London 1962
 - b) Electrophoretic separation of
lactate dehydrogenase isoenzy-
mes on cellulose acetate.
biochem.J. 84, 83 P, London 1962
 - c) The staining of lactic dehydro-
genase isoenzymes after electro-
phoretic separation on cellulose
acetate.
J.Clin.Pathol. 17, 567, London
1964
- 2) BERG, G.F.SCHEIFFARTH,
H.GÖTZ
Untersuchung des Blutes, in N.
Henning (Herausg.) Klinische Labo-
ratoriumsdiagnostik, 3. Aufl.
Urban & Schwarzenberg, München,
Berlin, Wien 1966, S.60-101
- 3) BIEL, H., N.HEIMBURGER,
D.KRAFT, TH.KRANZ,
R.SCHMIDTBERGER
Einige neuere analytische Metho-
den zur Charakterisierung der
Plasmaproteide.
Behringwerk-Mitteilungen Heft 43,
Seite 1 - 82 (1964)
- 4) BIEL, H., O.ZWISLER
Über Elektrophorese in horizon-
talem Polyacrylamid-Gel.
4. Mitteilung: Nachweis und Cha-
rakterisierung von Proteinen des
menschlichen Serums mittels PAA-
Gel-Elektrophorese und ange-
schlossener Immundiffusion.
Behringwerk-Mitt. 46, S.141-165
- 5) DEWEY, M.M.,
J.L.CONKLIN
Starchgel electrophoresis of
lactic dehydrogenase from rat
kidney.
Proc.Soc.exp. Biol.Med.105:492
(1960)
- 6) FERRIS, T.G., R.E.EASTER-
LING and R.B.BUDD
Electrophoresis of serum pro-
teine in acrylamide gel
- 7) GÖTZ, H., G.BERG
und F.SCHEIFFARTH
Methodische Grundlagen der
Immunoelektrophorese Z.
Immunit.forsch., 114, (1957) S.72

- 8) GÖTZ, H. und
F. SCHEIFFARTH
Immunelektrophoretische Untersuchung an Organextrakten.
Klin. Wschr. 41, 587.589 (1964)
- 9) GÖTZ, H. F. SCHEIFFARTH
und F. VICTOR
Studien über das Enzymmuster esteraktiver Komponenten in pathologischen Seren.
Clin. Chim. Acta, 21 (1968) 119-126
- 10) GRABAR, P.
Etudes sur les protéines à l'aide de méthodes immunochimiques
Bull. Soc. Chim. Biol., 36(1954) 65
- 11) GRABAR, P. und BURTIN
a) Analyse immuno-électrophorétique. Masson u. Cie., Paris, 1960
b) Immunelektrophoretische Analyse
Elsevier, Amsterdam, 1964
- 12) HAUPT, H., K. HEIDE,
O. ZWISLER und
H. G. SCHWICK
Isolierung und physikalisch-chemische Charakterisierung der Cholinesterase aus Humanserum.
Blut, 14 (1966) 65
- 13) KOHN, J.
a) A new supporting medium for zone electrophoresis.
Biochem. J. 65, 9 (1957)
b) A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis.
Clin. Chim. Acta 2, 297 (1957)
c) Rapid small-scale electrophoresis of abnormal haemoglobins
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 52, 4 (1958)
d) A lipoprotein staining method for zone electrophoresis.
Nature 189, 312 (1961)
e) Zur Technik der Celluloseacetat-Elektrophorese.
Ärztl. Lab. 10, 233 (1964)
f) Zur Technik der Celluloseacetat-Elektrophorese.
Ärztl. Lab. 10, 269 (1964)

- 14) MAURER, H.R. Disc.-Elektrophorese Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese Walter de Gruyter, Berlin, 1968
- 15) SCHEIFFARTH, F., H.GÖTZ und S.EBERT Über esteraktive Fraktionen in verschiedenen menschlichen Organextrakten. Clin.Chim.Acta, 14, 519-527 (1966)
- 16) SCHEIFFARTH, F., H.GÖTZ und R.FRICK Agarelektrophoretische Studien zum Nachweis von Isoenzymen der Lactatdehydrogenase in verschiedenen menschlichen Organextrakten. Enzym.biol.clin., 8, 283-297 (1967)
- 17) SCHEIFFARTH, F., H.GÖTZ und M.GROTKE Vergleichende biochemische Untersuchungen an unterschiedlich aufbereiteten Leberextrakten. Clin.Chim.Acta 20, (1968)
- 18) SCHEIFFARTH, F., H.GÖTZ und H.KNOPFF Die Bedeutung kombinierter Färbef verfahren nach immunoelktrophoretischer Analyse pathologischer Seren. Acta haematologica, 26, 169-181 (1961)
- 19) SECCI, G.C. und E.CIRLA Caratterizzazione della esteras albuminica in un siero bisalbuminico Boll.Soc.Ital.Sper.Biol. 40/24 2071 (1965)
- 20) SECCI, G.C. und DIOGUARDI Multiple forms of serum esterases in the normal state and in cirrhosis of the liver. Enzymol.Biol.Clin., 2, 29 (1965)
- 21) URIEL, J. a) Caractérisation des cholinestérases et d'autres estérases carbonyliques après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose Ann.Inst.Pasteur, 101 (1961) 104
b) in P.Grabar und P.Burtin Analyse Immunoélectrophorétique Masson, Paris, 50-53 (1960)

22) VAN DER HELM H.J.

A simplified method of demonstrating lactic dehydrogenase isoenzymes in serum
Clin.Chim.Acta 7,124 (1962)

23) ZWISLER , O.
und H.BIEL

- a) Elektrophorese in horizontalem PAA-Gel
1.Mitt.:Einfluß verschiedener Elektrophoresebedingungen auf die Auflösung von Humanserum.
Z.klin.Chem.4,58-62(1966)
- b) über Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamid-Gel.
3.Mitt.:Die Kombination von Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Immundiffusion.
Behringwerk-Mitt.46,129-139 (1966)

Lebenslauf.

Am 2.10.1935 wurde ich als Sohn des Bäckermeisters Eduard Heinze und seiner Ehefrau Angela, geborene Kutz, zu Gleiwitz O/S , geboren. Im Januar 1945 mußten meine Eltern durch das Kriegsgeschehen die alte Heimat verlassen. In Jößnitz bei Plauen i.V. wurde der neue Wohnsitz gegründet , wo ich auch die Volksschule besuchte. Anschließend trat ich in die Diesterweg-Oberschule in Plauen ein. Im Jahre 1955 habe ich das Abitur bestanden, 1956 die vorgeschriebene Sonderprüfung für Abiturienten der sowjetisch besetzten Zone. Ich hatte den Wunsch Medizin zu studieren. Im Jahre 1965 habe ich das Physikum an der Universität in Erlangen-Nürnberg bestanden. Im Frühjahr 1969 beabsichtige ich das Staatsexamen abzulegen.

Hans-Georg Heinze

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
